



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication: 0 432 490 A2

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 90121752.1

⑮ Int. Cl.⁵ A61K 39/07, A23C 9/12

⑭ Date de dépôt: 14.11.90

⑯ Priorité: 13.12.89 CH 4484/89

⑯ Demandeur: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE

⑰ Date de publication de la demande:
19.06.91 Bulletin 91/25

S.A.

Case postale 353

CH-1800 Vevey(CH)

⑲ Etats contractants désignés:
AT BE DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE

⑰ Inventeur: Link, Harriet

Boulevard St-Martin 16

CH-1800 Vevey(CH)

Inventeur: Pahud, Jean-Jacques

Baumarache 2

CH-1801 Mont-Pelerin(CH)

⑳ Agent immunostimulant.

㉑ Agent immunostimulant comprenant des N-acétyl-muramyl-peptides dérivés de peptidoglycane de la paroi cellulaire de bactéries lactiques sensibles au lysozyme.

EP 0 432 490 A2

AGENT IMMUNOSTIMULANT

La présente invention a pour objet un agent immunostimulant et un procédé de préparation d'un tel agent, ainsi qu'une utilisation de cet agent et/ou de ce procédé dans le domaine des laits fermentés.

On connaît un procédé de préparation d'un agent anticarcinogène, dans lequel on cultive un lactobacille, notamment le *Lactobacillus bulgaricus*, on l'hydrolyse avec une enzyme protéolytique et l'on extrait de l'hydrolysat un produit riche en protéine et en acide ribo-nucléique qui présente une activité anticarcinogène.

On connaît par ailleurs un procédé de préparation d'un produit diététique à base de lait pour les enfants, dans lequel on supplémente un lait, acidifié par *Lactobacillus acidophilus*, avec des oligoéléments, des vitamines et une solution de lysozyme. Ce dernier est sensé remplacer le lysozyme présent dans le lait maternel et améliorer la conservation, le goût et la texture de ce produit diététique.

La présente invention a pour but de proposer un agent immunostimulant efficace, obtenable à partir d'une bactérie lactique, et particulièrement indiqué pour une utilisation dans le domaine des laits fermentés.

A cet effet, l'agent immunostimulant selon la présente invention comprend des N-acétyl-muramyl-peptides dérivés par hydrolyse avec du lysozyme de peptidoglycane de la paroi cellulaire de bactéries lactiques sensibles au lysozyme, notamment de *Lactobacillus bulgaricus*.

De même, dans le procédé de préparation d'un agent immunostimulant selon la présente invention, on hydrolyse avec du lysozyme les peptidoglycane de la paroi cellulaire de bactéries lactiques sensibles au lysozyme, notamment de *Lactobacillus bulgaricus*, pour en dériver des N-acétyl-muramyl-peptides. On a constaté en effet qu'un tel agent présente un effet stimulant remarquable de la réponse immunitaire, notamment de la réponse immunitaire aux bactéries entéropathogènes gram négatives, telles qu'*E.coli* par exemple.

Un tel agent se prête particulièrement bien à une utilisation dans un lait fermenté, notamment dans un yogourt ou dans un produit lactosérique.

De même, un tel procédé se prête bien à une utilisation, autrement dit peut être directement réalisé dans le cadre de la préparation d'un lait fermenté, notamment d'un yogourt, ou dans la préparation d'un produit lactosérique.

La présente invention s'étend donc également à ces utilisations.

Dans le présent exposé, l'effet immunostimulant du présent produit est estimé de manière qualitative sur le modèle de la souris. On sait que, si les résultats de tels essais ne sont pas directement transposables à l'homme, ils n'en fournissent pas moins des indications utiles.

Dans le présent exposé également, l'expression "bactéries lactiques sensibles au lysozyme" est utilisée dans le sens de bactéries lactiques dont la paroi cellulaire comprend des peptidoglycane hydrolysables par le lysozyme, autrement dit dégradables en N-acétyl-muramyl-peptides sous l'action du lysozyme.

Pour mettre en oeuvre le présent procédé, on peut utiliser une culture ou une suspension pure de bactérie lactique sensible au lysozyme, ou une culture ou une suspension mixte comprenant des bactéries sensibles et non sensibles au lysozyme. On peut notamment utiliser une culture pure de *Lactobacillus bulgaricus* ou une culture mixte de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*, autrement dit une culture de yogourt, telle qu'on en trouve dans le commerce, par exemple.

On peut utiliser en particulier une culture ou une suspension contenant 10^6 - 10^{10} cellules de bactérie lactique sensible au lysozyme par ml. Pour produire une quantité désirée de cellules en concentration suffisante, on peut inoculer un milieu de culture adéquat avec une culture d'ensemencement de ladite bactérie et incuber à une température et à un pH favorables à la croissance de la bactérie, durant un temps suffisant pour rétablir dans le milieu de culture une concentration de cellules comparable à celle de la culture d'amorçage. Ledit milieu de culture adéquat peut être un milieu lacté, tel qu'un lait de vache écrémé ou non, un lactosérum, un perméat d'ultrafiltration, ou un milieu synthétique, par exemple.

On utilise de préférence une culture de *L.bulgaricus*. Pour la préparer, on peut inoculer un lait de vache, ou un milieu synthétique tel que le milieu MRS (Difco), par exemple, avec une culture d'ensemencement de ce microorganisme et incuber durant 3-6 h à 37-45 °C. Si l'on incube durant moins de 3 h ou à moins de 37 °C, on risque de demeurer dans la phase dite latente, autrement dit la phase de démarrage de la multiplication du microorganisme, ou de ne pas être assez longtemps engagé dans la phase dite exponentielle, autrement dit la phase de multiplication exponentielle du microorganisme.

Par contre, si l'on incube durant plus de 6 h, on risque d'entrer dans la phase stationnaire, autrement dit la phase où la multiplication du microorganisme cesse et au cours de laquelle la composition de la paroi cellulaire peut se modifier de manière défavorable. Enfin, au-delà de 45 °C la température n'est plus

favorable à la croissance de *L.bulgaricus*.

On réalise donc ladite hydrolyse avec du lysozyme. Celui-ci peut provenir de toute source adéquate, notamment de la présure, en particulier de la présure de ruminant (surtout bovin), ou du blanc d'oeuf, sous forme pure ou non. Dans une forme d'exécution particulière du présent procédé, on utilise en effet la présure elle-même, sans en avoir séparé le lysozyme.

On peut réaliser l'hydrolyse desdits peptidoglycans de la paroi cellulaire desdites bactéries lactiques à 15 -37 °C, durant 1-48 h, de préférence 12-24 h, à l'aide de 1-500 µg de lysozyme par ml d'une culture contenant 10^6 - 10^{10} cellules de ces bactéries par ml, par exemple, à un pH favorable à l'action du lysozyme utilisé. Ce pH est d'environ 4-6 pour un lysozyme de présure et d'environ 6-8 pour un lysozyme de blanc d'oeuf, par exemple.

Pour réaliser les utilisations selon la présente invention, on peut d'une part ajouter le présent agent, tel quel ou sous forme d'extrait aqueux, à un lait fermenté tel qu'un yogourt liquide ou brassé, ou à un produit lactosérique tel qu'une boisson à base de lactosérum. La quantité d'agent ajouté peut correspondre à la quantité de N-acétyl-muramyl-peptides dérivés des parois de 10^6 - 10^{10} cellules de bactéries lactiques sensibles au lysozyme, par ml dudit lait fermenté ou dudit produit lactosérique, par exemple.

On peut d'autre part réaliser ladite hydrolyse dans un lait fermenté, notamment par *L.bulgaricus* seul ou en combinaison avec *S.thermophilus*, ou dans un lactosérum, par exemple. Dans le cas du lait fermenté, on peut ajouter le lysozyme dans le lait avant, pendant ou après sa fermentation, à raison de environ 1-500 g de lysozyme par ml de lait, par exemple. Dans le cas du lactosérum, on peut lui ajouter lesdites bactéries sensibles au lysozyme, on peut même, le cas échéant, les y cultiver, et on peut ajouter, si nécessaire, du lysozyme.

Les exemples ci-après sont présentés à titre d'illustration de la présente invention. Les pourcents y sont donnés en poids, sauf indication contraire.

L'effet immunostimulant, autrement dit l'effet stimulant de la réponse immunitaire, est estimé par l'intermédiaire d'une détermination de concentrations en anticorps spécifiques, sur la souris, par le test ELISA.

Ce dernier test, bien connu de l'homme du métier, consiste à doser une enzyme marquant un anti-anticorps qui se lie à un anticorps spécifique d'une immunoglobuline, telle que IgG, IgM ou IgA, qui se lie à un antigène, tel qu'un antigène bactérien, par exemple, lui-même fixé sur un support insoluble en milieu aqueux.

Exemple 1

On prépare un milieu de culture synthétique, consistant en un milieu MRS (Difco Lab., USA) modifié, présentant la composition suivante (exprimée en g de matière sèche par litre de milieu):

40	hydrolysat de protéines	10
	extrait de viande	10
45	extrait de levure	5
	glucose	20
	lactose	10
50	émulsifiant	1
	citrate d'ammonium	2
	acétate de sodium	5
	$MgSO_4$	0,1
	$MnSO_4$	0,05
	K_2HPO_4	2

55 Ce milieu de culture synthétique présente un pH de 6,5. On le stérilise durant 15 min à 121 °C. On l'inocule avec une culture d'ensemencement de *Lactobacillus bulgaricus*, en l'occurrence une culture du *L.bulgaricus* NCDO 1489 (National Culture of Food Bacteria, AFRC Institute of Food Research, Reading

Laboratory, Shinfield, Reading, RG2 9AT UK).

On incube à 40 °C durant 6 h. On sépare la biomasse, on la lave et on la sépare en deux parties A et B. On met la partie A en suspension dans un tampon phosphate 0,02 M à pH 7 et la partie B en suspension dans un tampon acétate 0,01 M à pH 5, à raison de 2.10⁹ cellules du microorganisme par ml.

5 On hydrolyse les cellules de *L.bulgaricus* de la suspension A avec un lysozyme de blanc d'oeuf du commerce (Calbiochem, Allemagne fédérale). On hydrolyse les cellules de *L.bulgaricus* de la suspension B avec un lysozyme de préure extrait et purifié comme décrit par J.J.Pahud et al. dans Biochem.J.201, 661-664 (1982).

Pour ce faire, on ajoute 16 µg de lysozyme par ml de suspension et l'on incube à 25 °C, durant 18 h.

10 On centrifuge et on filtre le surnageant sur une membrane présentant des pores de 0,45 µm de diamètre.

On obtient ainsi deux agents immunostimulants A et B, sous forme de solutions stériles ou extraits contenant les N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de blanc d'oeuf (A) ou de préure (B), des parois cellulaires de 2.10⁹ cellules de *L.bulgaricus* par ml.

15 On vérifie l'effet immunostimulant de ces agents A et B sur la souris de race "Swiss white" (Tuttlingen, Allemagne fédérale), selon le protocole expérimental suivant:

Six groupes numérotés de 1 à 6 comprenant chacun 6 souris de 18-20 g reçoivent une diète normale et de l'eau à volonté. A compter du début de l'expérience au jour dit 0, on procède à des intubations orales aux jours 1, 3, 5, 15, 17, 19 et 30. La diète et l'eau sont retirées aux souris 3 h avant chacune de ces intubations et rétablis immédiatement après. Des sera sont prélevés des souris aux jours 0, 29 et 40. Un lavage intestinal est pratiqué au jour 40.

20 Chaque intubation orale est réalisée avec une dose de 0,5 ml par souris. La composition de ces doses est la même pour les souris du même groupe, mais elle varie de groupe en groupe conformément au tableau I ci-après. Dans ce tableau, la rubrique "vaccin" indique que l'on a mis en suspension, par dose, 5.10⁹ cellules d'*Escherichia coli* 0111:K58 dont une moitié ont été inactivées durant 1 h à 100 °C et l'autre moitié ont été inactivées avec une solution de glutaraldéhyde à 0,05% (Hilpert et al., Food and Immunology, 1977, Ed.L.Hambræux, L.A.Hanson, H.Mc Farlane, Swedish Nutrition Foundation Symposium XIII, 182-196). Les lettres CT désignent la toxine du choléra, un agent immunostimulant bien connu de l'homme du métier.

25 L'expression "eau physiologique" désigne de l'eau distillée contenant 0,9% de NaCl.

30

TABLEAU I

35

40	Groupe	Liquide de base	Substances ajoutées		
			NaHCO ₃	autres	%
45	1	eau physiologique	3	-	-
	2	"	3	-	1 µg CT
	3	"	3	vaccin	-
	4	"	3	vaccin	1 µg CT
50	5	agent A	3	vaccin	-
	6	agent B	3	vaccin	-

55 On détermine par le test ELISA la concentration en anticorps IgG et IgM des sera, ainsi que la concentration en anticorps IgG et IgA des fluides de lavage intestinaux prélevés des souris. Le tableau II ci-dessous présente les valeurs relatives obtenues. Les chiffres indiqués sont une moyenne géométrique des valeurs déterminées pour chacune des six souris d'un même groupe. Les astérisques indiquent que pour les chiffres ainsi marqués, la probabilité que l'on fasse erreur en prétendant qu'il sont différents du

chiffre correspondant (même colonne) du groupe 3 (témoin, souris qui n'ont reçu que le vaccin seul) est inférieure à 5%. En d'autres termes, pour les chiffres marqués d'une astérisque, la valeur "p", déterminée par analyse de variance unilatérale, est plus petite que 0.05.

5

TABLEAU II

10	Groupe	ex sera:		ex fluide intestinal:		
		IgG	IgM	IgG	IgA	
15		j29	j40	j29	j40	j40
20	1	69	57	36	39	8
	2	96	94	25	80	10
	3	189	489	31	83	11
	4	572*	759	113	123*	13
25	5	525*	828	104	141*	18
	6	397*	1362*	39	45	24*
						72*

30 On constate donc que les sera prélevés aux jours 29 et 40 présentent une augmentation d'un facteur de environ 2-3 de la concentration en anticorps IgG pour les souris ayant reçu le vaccin et les agents A ou B (invention, groupes 5 et 6) ou CT (comparaison, groupe 4), par rapport aux souris qui n'ont reçu que le vaccin seul (témoin, groupe 3). L'augmentation de la concentration en anticorps IgM ne se constate pas contre que pour l'agent A (invention, groupe 5) et CT (comparaison, groupe 3).

35 La concentration en anticorps IgG et IgA dans les fluides intestinaux des souris ayant reçu le vaccin et les agents A ou B (invention, groupes 5 et 6) présente également une augmentation très nette par rapport à celle des fluides intestinaux des souris ayant reçu le vaccin seul (témoin, groupe 3).

Exemple 2

40 On prépare une biomasse de *L.bulgaricus* de la manière décrite à l'exemple 1. On la met en suspension dans un tampon acétate 0.01 M à pH 5, à raison de $1.6 \cdot 10^9$ cellules du microorganisme par ml.

On ajoute à cette suspension 1% de présure liquide contenant 4% de lysozyme (Laboratoire Présure Granday, Beaune, France). On incube sous légère agitation durant 18 h à 25°C. On centrifuge et on filtre le surnageant sur une membrane à pores de 0.45 μm de diamètre.

On obtient ainsi un agent immunostimulant C sous forme de solution stérile ou extrait contenant les N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de présure, sous forme de la présure elle-même, des parois cellulaires de $1.6 \cdot 10^9$ cellules de *L.bulgaricus* par ml.

On vérifie l'effet immunostimulant de cet agent C sur la souris de race "Swiss white" de manière semblable à celle décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'agent immunostimulant n'est pas administré aux souris par intubation, mais qu'il est ajouté à l'eau dont elles s'abreuvent librement, à raison de 1 partie d'agent pour 50 parties d'eau. Durant toute l'expérience, on met 10 ml de lipide par 24 h à disposition des souris dont le besoin quotidien est d'environ 4-7 ml.

Quatre groupes de six souris chacun, numérotés de 1-4, reçoivent une diète normale. Deux de ces groupes reçoivent de l'eau physiologique à volonté. Les deux autres reçoivent de l'eau physiologique à laquelle on a ajouté l'agent immunostimulant C. En outre, les souris de deux de ces groupes reçoivent également un vaccin d'*E.coli* par intubation orale, de manière semblable à celle décrite au protocole expérimental de l'exemple 1. Le tableau III ci-après résume ce programme d'alimentation et ou de

vaccination des souris des différents groupes.

TABLEAU III

5

	Groupe	Liquide	Intubation
10	1	eau physiologique	-
	2	eau physiologique + agent C	-
	3	eau physiologique + agent C	vaccin
15	4	eau physiologique + agent C	vaccin

On détermine par le test ELISA la concentration en anticorps IgG et IgM des sera, ainsi que la concentration en anticorps IgA des fluides de lavage intestinaux prélevés des souris. Le tableau IV ci-dessous présente les valeurs relatives obtenues.

20

TABLEAU IV

25

	Groupe		ex sera	
		IgG	IgM	IgA
30		j29	j40	j40
35	1	77	68	54
	2	96	78	37
	3	1427	1213	71
40	4	2365	3180*	219**
				360**
				31

* valeur "p" = 0,065

45 ** valeur "p" = 0,014

On constate donc que les sera prélevés aux jours 29 et 40 présentent une augmentation d'un facteur de environ 2-3, voire davantage, de la concentration en anticorps IgG et IgM pour les souris ayant reçu le vaccin et ayant bu une eau additionnée de l'agent C (invention, groupe 4), par rapport aux souris qui n'ont reçu que le vaccin seul (témoin, groupe 3). Par contre, on ne voit guère de différence entre les concentrations en anticorps IgA pour les souris de ces groupes 3 et 4.

Exemple 3

55 On inocule un lait de vache avec 3% en volume d'une culture d'ensemencement pure du commerce, contenant environ 10^8 cellules de *Lactobacillus bulgaricus* par ml. On incube 5 h à 40 °C. On obtient une culture pure de *L.bulgaricus* contenant environ 10^8 cellules de ce microorganisme par ml et présentant un pH de 4,6.

On ajoute à la culture 20 µg/ml de lysozyme de présure. On incube durant 12 h à 25 °C.

On obtient ainsi un agent immunostimulant contenant par ml les N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de présure, des peptidoglycanes des parois de 10^8 cellules de *L.bulgaricus*.

5 Exemple 4

On procède de la manière décrite à l'exemple 3, jusqu'à l'obtention de la culture pure de *L.bulgaricus*.

On ajoute à la culture 1% de présure liquide contenant elle-même environ 4% de lysozyme. On incube durant 8 h à 20 °C.

10 On obtient ainsi un agent immunostimulant contenant par ml les N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec le lysozyme de la présure, des peptidoglycanes des parois de 10^8 cellules de *L.bulgaricus*.

Exemple 5

15 On inocule un lait de vache avec 5% en volume d'une culture d'ensemencement mixte contenant, par ml, environ 5.10^7 cellules de *Lactobacillus bulgaricus* et environ 2.10^8 cellules de *Streptococcus thermophilus* obtenues à partir de cultures du commerce. On incube à 43 °C durant 3 h. On obtient un yogourt contenant environ 2.10^7 cellules de *L.bulgaricus* et environ 10^8 cellules de *S.thermophilus* par ml.

20 On ajoute à ce yogourt 50 µg de lysozyme de présure par ml. On incube 12 h à 25 °C et l'on refroidit à 4 °C.

On obtient ainsi un produit du type yogourt présentant les propriétés d'un agent immunostimulant contenant par ml les N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de présure, des peptidoglycanes des parois de 2.10^7 cellules de *L.bulgaricus*.

25 Exemple 6

On procède de la manière décrite à l'exemple 5, jusqu'à l'obtention du yogourt. On ajoute à ce yogourt 1% de présure liquide contenant 4% de lysozyme. On laisse incuber 24 h à 25 °C.

30 On obtient ainsi un produit du type yogourt présentant les propriétés d'un agent immunostimulant contenant par ml les N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de présure, des peptidoglycanes des parois de 2.10^7 cellules de *L.bulgaricus*.

Exemple 7

35 On centrifuge le produit obtenu à l'exemple 6 et l'on recueille le lactosérum. Celui-ci représente lui-même un agent immunostimulant riche en N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de présure, de peptidoglycanes de parois cellulaires de *L.bulgaricus*.

Exemple 8

40 On inocule un lactosérum doux de fromagerie avec une culture d'ensemencement de *Lactobacillus bulgaricus*. On incube 6 h à 42 °C.

On refroidit à 25 °C. On ajoute 1% de présure contenant elle-même 4% de lysozyme. On incube 18 h à 25 °C.

45 On obtient un agent immunostimulant riche en N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme de présure, de peptidoglycanes de parois cellulaires de *L.bulgaricus*.

Revendications

50

1. Agent immunostimulant, comprenant des N-acétyl-muramyl-peptides dérivés, par hydrolyse avec du lysozyme, de peptidoglycanes de la paroi cellulaire de bactéries lactiques sensibles au lysozyme.
2. Agent selon la revendication 1, dans lequel ladite bactérie sensible au lysozyme est le *Lactobacillus bulgaricus*.
3. Agent selon la revendication 1, stimulant de la réponse immunitaire aux bactéries entéro-pathogènes gram-négatives.

4. Agent selon la revendication 1, stimulant de la réponse immunitaire à E.coli.
5. Procédé de préparation d'un agent immunostimulant, dans lequel on hydrolyse avec du lysozyme les peptidoglycanes de la paroi cellulaire de bactéries lactiques sensibles au lysozyme, pour en dériver des N-acétyl-muramyl-peptides.
6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel ladite bactérie lactique sensible au lysozyme est le *Lactobacillus bulgaricus*.
7. Procédé selon la revendication 5, dans lequel le lysozyme est un lysozyme de présure, sous forme purifiée ou sous forme de la présure elle-même.
8. Procédé selon la revendication 5, dans lequel le lysozyme est un lysozyme de blanc d'oeuf.
9. Procédé selon la revendication 6, dans lequel, pour préparer des cellules de *L.bulgaricus* à hydrolyser, on inocule un lait de vache ou un milieu de culture synthétique avec une culture d'ensemencement de ce microorganisme, et l'on incube durant 3-6 h à 37-45 ° C.
10. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on réalise l'hydrolyse à 15-37 ° C, durant 1-24 h, à l'aide de 1-500 µg de lysozyme par ml d'une culture contenant 10^6 - 10^{10} cellules de bactérie lactique sensible au lysozyme par ml.
11. Utilisation d'un agent immunostimulant selon la revendication 1, dans un lait fermenté, notamment dans un yogourt, ou dans un produit lactosérique.
12. Utilisation du procédé selon la revendication 5, dans la préparation d'un lait fermenté, notamment d'un yogourt, ou dans la préparation d'un produit lactosérique.

30

35

40

45

50

55



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication:

0 432 490 A3

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 90121752.1

⑮ Int. Cl.5: **A61K 39/07, A23C 9/12**

⑭ Date de dépôt: 14.11.90

⑯ Priorité: 13.12.89 CH 4484/89

⑰ Demandeur: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE

S.A.

Case postale 353

CH-1800 Vevey(CH)

⑯ Date de publication de la demande:

19.06.91 Bulletin 91/25

⑰ Inventeur: Link, Harriet

Boulevard St-Martin 16

CH-1800 Vevey(CH)

Inventeur: Pahud, Jean-Jacques

Baumaroche 2

CH-1801 Mont-Pelerin(CH)

⑯ Etats contractants désignés:

AT BE DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE

⑯ Date de publication différée du rapport de

recherche: 21.08.91 Bulletin 91/34

⑯ Agent immunostimulant.

⑯ Agent immunostimulant comprenant des N-acétyl-muramyl-peptides dérivés de peptidoglycanes de la paroi cellulaire de bactéries lactiques sensibles au lysozyme.

EP 0 432 490 A3



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL5)
Y	FR-A-2 520 379 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL) * En entier * - - -	1-12	A 61 K 39/07 A 23 C 9/12
Y	EP-A-0 089 266 (PIERRE FABRE S.A.) * En entier * - - -	1-12	
Y	GB-A-2 046 759 (RHONE-POULENC INDUSTRIES) * En entier * - - -	1-12	
Y	BIOTHERAPY, vol. 1, no. 3, 8 décembre 1989, pages 169-177; K. NOMOTO et al.: "Augmentation of resistance of mice to bacterial infection by a polysaccharide-peptidoglycan complex (PSPG) extracted from Lactobacillus casei" * En entier * - - - -	1-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)
			A 61 K A 23 C

Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications

Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
La Haye	27 mai 91	NOVOA Y SANJURJO M.A
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons
O : divulgation non-écrite		& : membre de la même famille, document correspondant
P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention		